

Relatório da Bolsa Universidade de Lisboa – Fundação Amadeu Dias

(01/12/2009 – 30/06/2010)

**Histopatologia da doença da murchidão do pinheiro
em *Pinus pinaster* infectados pelo nemátodo
*Bursaphelenchus xylophilus***

(no âmbito do Projecto PTDC/AGR-AAM/74579/2006)

Orientação: Professora Doutora Lia Ascensão

Bolseiro: Rafael Martins Galupa

ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS

A doença da murchidão do pinheiro – *pine wilt disease* (PWD) – foi detectada pela primeira vez na Europa em 1999 em pinheiros *Pinus pinaster* Aiton (pinheiro-bravo) na Península de Setúbal (Mota *et al.*, 1999). A sua recente expansão no território Português e detecção em Espanha, junto à fronteira, representa um elevado risco para as florestas de coníferas da Europa, onde *Pinus pinaster* é considerada uma das três mais importantes espécies de pinheiro (Azevedo, 2005). Em Portugal, o pinheiro-bravo é a espécie dominante das florestas de coníferas, ocupando praticamente um terço da área florestal (Correia *et al.*, 2006) e constituindo a principal fonte de madeira para a indústria de serração, carpintaria e mobiliário. A doença da murchidão do pinheiro é não só uma séria ameaça aos ecossistemas florestais como afecta gravemente a economia que tem por base a comercialização da madeira. Na Ásia, a doença tem devastado as florestas de pinheiros nativos desde 1971, nomeadamente as espécies *P. thunbergii* Perl e *P. densiflora* Sieb & Zucc, muito susceptíveis à doença (Mamiya, 1988), sendo as perdas económicas enormes, estando estimadas em cerca de 10 milhões de dólares por ano (Jones *et al.*, 2008).

O nemátodo da madeira do pinheiro (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Buhrer) Nickle, o agente responsável por esta doença, é um verme endoparasita com cerca de 1 mm de comprimento. O PWN foi descrito pela primeira vez em 1934, na América do Norte, por Steiner & Buhrer, embora nessa altura não se tenha estabelecido uma correlação entre a doença e o nemátodo. A transmissão dos nemátodos é mediada por insectos do género *Monochamus*, da família Cerambycidae, que ocorrem nas mesmas áreas geográficas das coníferas, sendo em Portugal *Monochamus galloprovincialis* a espécie-vector. Os nemátodos podem ser transmitidos durante a alimentação do insecto, essencialmente na copa das árvores, ou através da postura de ovos pelas fêmeas em troncos de árvores e ramos secos ou recentemente cortados. Aparentemente, o ciclo de vida do PWN inclui uma fase fitófaga e uma fase micófaga, dependendo da sua fonte de alimento, as células epiteliais que rodeiam os canais de resina dos pinheiros ou os fungos presentes na madeira morta.

A PWD que conduz as árvores infectadas à morte, num intervalo de poucas semanas ou meses, compreende duas fases de infecção: uma fase inicial, em que não há sintomas externos da doença, e uma fase avançada, quando a sintomatologia se traduz numa redução brusca da produção de resina e num rápido amarelecimento das agulhas das copas. Em Portugal, desde a sua detecção que as Autoridades Florestais têm vindo a implementar várias medidas de controlo, que incluem o corte das árvores infectadas e a demarcação de uma faixa de contenção fitossanitária em redor da área afectada. Apesar de todos estes esforços, a doença progrediu a uma velocidade espantosa, tendo já sido detectada pontualmente em Espanha. Em 2008 por várias vezes a murchidão do pinheiro foi notícia, chamando-se a atenção para a grave situação de devastação de pinheiro bravo na região centro do país (Lousã e Arganil). Presentemente, todo o território nacional foi declarado como zona afectada, sendo necessário certificar todas as movimentações de madeira.

O presente relatório dá conta do estudo que se desenvolveu ao longo de sete meses no Centro de Biotecnologia Vegetal (IBB), no Departamento de Biologia Vegetal da FCUL, no âmbito do Projecto PTDC/AGR-AAM/74579/2006. A orientação esteve a cargo da Prof. Dra. Lia Ascensão, tendo sido acompanhado em toda a experimentação pela Lic. Luísa Mota. De um modo geral pretendeu-se contribuir para um melhor conhecimento da doença, visto que o mecanismo pormenorizado da invasão da planta pelo nemátodo não foi ainda completamente descrito de modo a compreender-se a reacção do hospedeiro à progressão da doença. O objectivo específico foi observar e interpretar as alterações morfo-anatómicas induzidas pelo nemátodo *B. xylophilus* em caules de *Pinus pinaster* durante o decurso da doença.

METODOLOGIA

Etapa I - Inoculação dos nemátodos da madeira do pinheiro (PWNs). Um isolado virulento do nemátodo *Bursaphelenchus xylophilus* (HF, isolado da Península de Setúbal) foi mantido em cultura num micélio de *Botrytis cinerea* (De Bary) Whetzel, a crescer em meio de cevada/água, durante 7 dias a 25º C e na escuridão. Os nemátodos foram extraídos após 24h utilizando a técnica do funil de Baermann. Cerca de 1000 PWN (em diferentes estádios), suspensos em 1 mL de água, foram inoculados a cerca de 5-10 cm do ápice descortçado do caule de plantas *Pinus pinaster* de 2 anos de idade. Como controlos utilizaram-se plantas inoculadas com água e plantas não inoculadas. Todos os pinheiros foram mantidos numa estufa com temperatura e humidade controladas, sendo regados sempre que necessário e fertilizados uma vez por semana. (Esta etapa foi realizada no NemaLab-ICAM, Departamento de Biologia, Universidade de Évora, pelo Lic. Pedro Barbosa sob a orientação do Prof. Doutor Manuel Mota, responsável pelo Laboratório)

Etapa II – Amostragem. O estudo realizou-se em amostras de caules retiradas às 48 horas, 4 dias, 1, 3, 5 e 7 semanas a partir da inoculação dos pinheiros. Para cada tempo de amostragem foram utilizadas 4 árvores, considerando-se sempre 2 árvores-controlo e 2 árvores inoculadas com os PWNs.

Etapa III – Estudo morfológico por microscopia electrónica de varrimento. Secções de caule de *Pinus pinaster* controlos e infectados com PWN, nos referidos momentos de amostragem, foram fixadas em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 e desidratadas numa série crescente de acetonas. Após secagem pelo método do ponto crítico, as amostras foram montadas e metalizadas com uma fina película de ouro ($\pm 500 \text{ \AA}$ de espessura). As observações foram realizadas num microscópio electrónico de varrimento JEOL T220 (JEOL Ltd., Tokyo, Japão), a 15 ou 20 Kv. As imagens foram registadas em película a preto e branco Kodak T-MAX-120 pro.

Etapa IV – Estudo anatómico por microscopia óptica. Segmentos de caule de *Pinus pinaster* controlos e infectados com PWN, nos referidos momentos de amostragem, foram fixados em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7,2 e desidratados numa série crescente de etanol. A infiltração e inclusão das amostras foram realizadas em resina glicol-metacrilato (Historesin® Leica). Secções transversais e longitudinais, com 3-5 μm de espessura, foram obtidas num micrótomato rotativo Leica RM2155 (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha), equipado com uma faca de tungsténio. As lâminas histológicas foram coradas com Azul de Toluidina O, SAL (Safranina O, Azur II, Lugol), SAL/Azul de Toluidina O, PAS/Azul de Comassie e Ponceau/Azur II, de acordo com as recomendações dos respectivos autores. As observações foram realizadas num microscópio Leica DM2500 e as imagens captadas digitalmente com uma câmara Leica DFC500.

RESULTADOS

Pinheiros controle. Em *Pinus pinaster*, tal como em outras espécies do género *Pinus*, ocorrem no caule vários canais de resina. No córtex estão apenas presentes canais verticais enquanto que no xilema há canais de resina verticais e horizontais. Nos exemplares controle, não inoculados (Fig.A-1), o lúmen dos canais de resina corticais e do xilema está delimitado por uma ou duas camadas de células glandulares (Fig. A – 4,5). É nestas células, ricas em citoplasma, nomeadamente na camada de células que rodeia o lúmen (células epiteliais), que ocorre a biossíntese dos compostos terpénicos constituintes da resina. É também evidente que todos os tecidos do caule estão bem preservados, não havendo sinais de degenerescência celular. (Fig. A – 2-5)

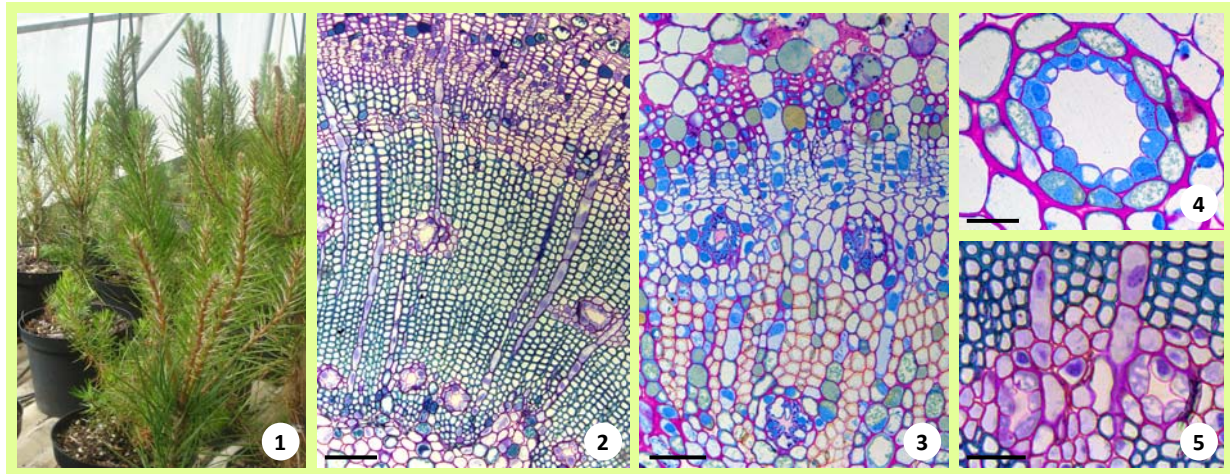


Fig. A – 1, Aspecto macroscópico de pinheiros-bravos não inoculados dois anos de idade (pinheiros controle). 2-5, Secções transversais do caule de pinheiros controle corados com Azul de Toluidina O (2,5) e PAS/Azul de Comassie (3,4). Barras = 100 μ m (2), 50 μ m (3-5)

Pinheiros infectados. A progressão da doença é geralmente descrita em duas fases principais: uma fase inicial, em que não há sintomatologia externa (Fig. D – 1), e uma fase avançada, em que as agulhas da copa das árvores se tornam amarelas (Fig. D – 2). Uma semana após a inoculação (Fig. B – 1-3), apenas um pequeno número de nemátodos está presente no lúmen dos canais de resina que ocorrem quer no córtex e quer no xilema. É nesse período que se começam a observar os primeiros sinais de degradação das células cambiais, das células epiteliais dos canais resiníferos, das células do parênquima cortical e das células dos raios parenquimatosos do xilema. Três semanas depois da inoculação (Fig. B – 4-6), o número de nemátodos aumenta e a degenerescência das células é mais óbvia, começando a aparecer as primeiras cavidades (Fig. B – 5, seta dupla). Cinco semanas após a inoculação (Fig. C – 1-3; Fig. D – 3), já na fase avançada da infecção, as paredes celulares apresentam rupturas e sinais evidentes de degradação, o que sugere digestão enzimática por acção de uma intensa actividade celulásica e pectinásica. Os PWNs poderão, à medida que migram nos tecidos do caule, do exterior para o interior, excretar essas enzimas, abrindo assim caminho até ao lúmen dos canais resiníferos onde parecem proliferar. O número de idioblastos taniníferos aumenta também consideravelmente, mostrando que houve activação de mecanismos de defesa da planta, nomeadamente de síntese de metabolitos secundários tais como os polifenóis. Nalguns casos é bem patente o aumento do número de camadas concêntricas de células em redor do lúmen dos canais de resina (Fig. C – 1). Sete semanas depois da inoculação (Fig. C – 4-6; Fig.D – 4), a maioria das células epiteliais dos canais resiníferos está completamente destruída, registando-se um assinalável aumento da população de nemátodos (Fig. C – 4, 5). Observam-se cavidades irregulares praticamente em todo o córtex, formadas quer por degradação dos canais de resina e das células do parênquima circundantes, quer por degenerescência das células do

câmbio e do floema, na zona de transição do córtex para o cilindro central. Neste estágio todos os tecidos do caule mostram sinais evidentes de degradação ocorrendo na medula grandes lacunas (Fig. C – 6).

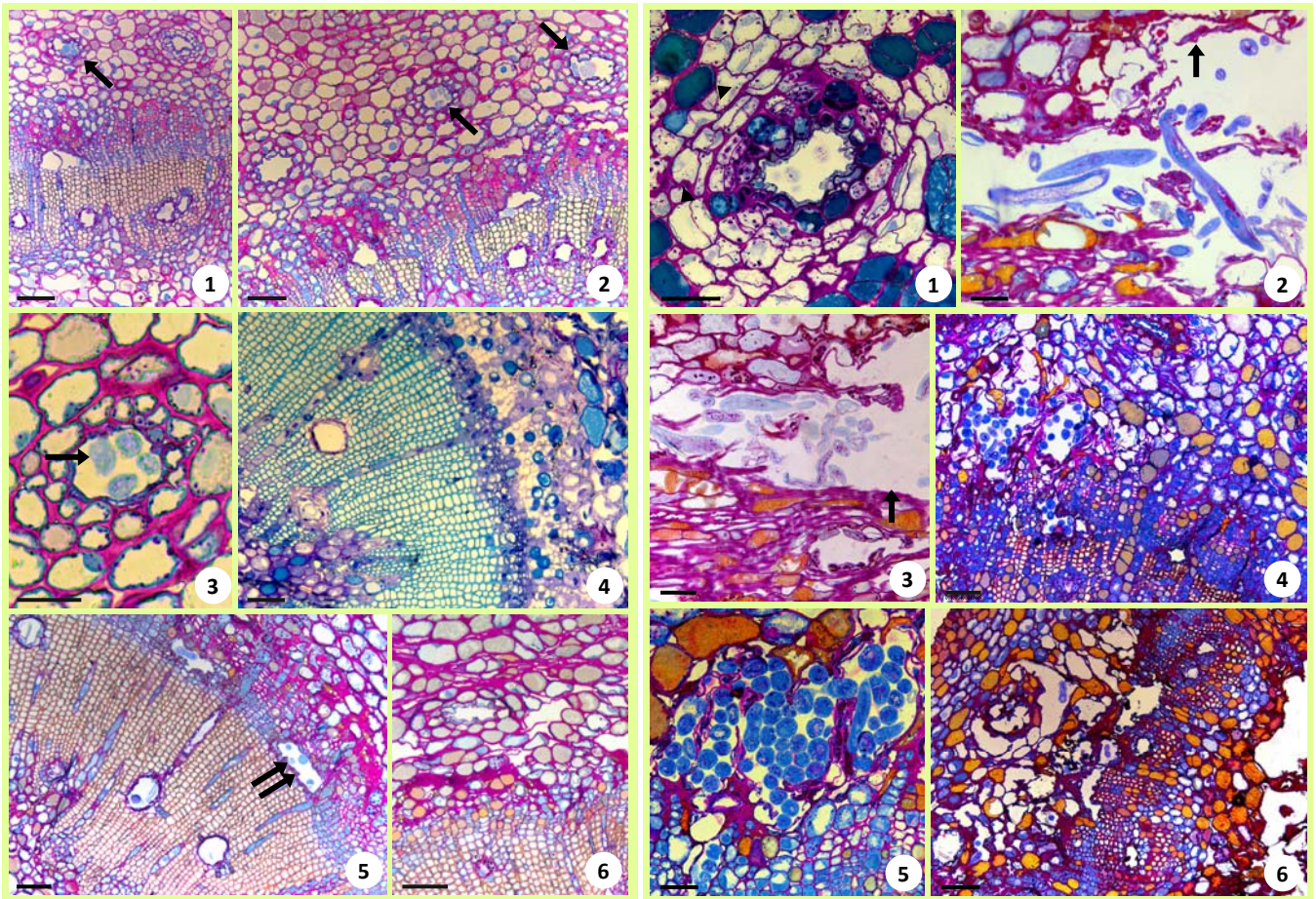


Fig. B

Fig. C

Figs. B, C – Histopatologia de *P. pinaster* com 2 anos após inoculação com *Bursaphelenchus xylophilus*.

Fig. B – Secções transversais de caule coradas com PAS/Azul de Toluidina O (1-3, 5-6) e Azul de Toluidina O (4). Aspectos histológicos 1 semana após a inoculação (1-3) e três semanas após a inoculação (4-6). Observam-se secções de nemátodos no lúmen dos canais de resina (setas) e em cavidades na região do câmbio (seta dupla). Barras = 50 µm (3), 100 µm (1-2, 4-6)

Fig. C – Secções transversais de caule coradas com PAS/Azul de Toluidina O (7) e PAS/Azul de Coomassie (8-12). Aspectos histológicos após cinco semanas de infecção (1-3) e sete semanas de infecção (4-6). É bem visível a degradação das paredes celulares (setas) assim como o elevado número de idioblastos taniníferos (pontas de setas). Na figura 4 e 5 observam-se numerosos nemátodos no lúmen de cavidades irregulares que resultaram da degradação de células. Barras = 100 µm (4, 6), 50 µm (1-3, 5).

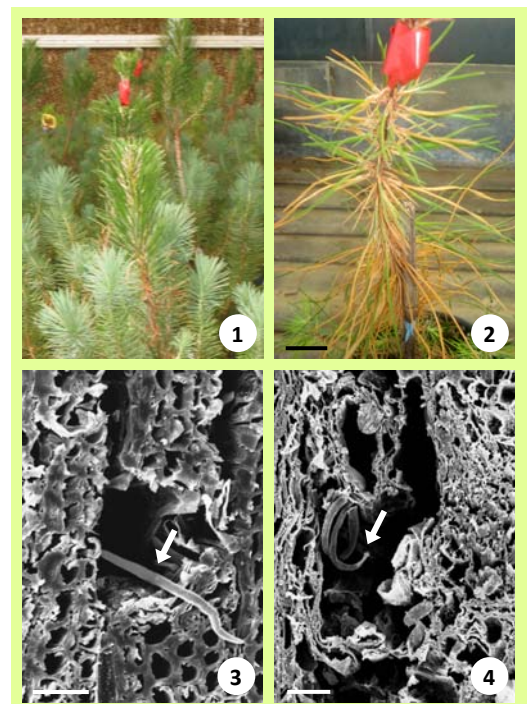


Fig. D – Aspecto macroscópico de *Pinus pinaster* na fase inicial (1) e na fase avançada (2) da infecção. Microfotografias de SEM de *Bursaphelenchus xylophilus* nos tecidos do caule do pinheiro (3-4). 1, Pinheiro inoculado com PWN sem sintomatologia externa. 2, Pinheiro inoculado com PWN com evidente descoloração das agulhas 5 semanas após a inoculação. 3-4, Nemátodos (setas) em cavidades formadas a partir de canais de resina degradados, 5 e 7 semanas após a inoculação. Barras = 2 cm (2), 30 µm (3-4)

CONCLUSÕES

- A fase inicial da doença parece estender-se até 1 a 3 semanas após a inoculação, quando aparecem os primeiros sintomas externos. Contudo, este período é muito variável, reflectindo provavelmente não só a variabilidade genética dos espécimes bem como o seu vigor e o período do ano em que ocorre a infecção.
- Há, desde o início da infecção, um aumento do número de idioblastos contendo taninos e de camadas de células rodeando o lúmen dos canais resiníferos, comparativamente à histologia caulinar dos pinheiros controlos.
- Num estadio mais avançado da doença, há uma marcada degradação dos tecidos, mais evidente nas células do parênquima cortical, nas células cambiais e nas células da camada epitelial dos canais de resina. Formam-se cavidades com margens irregulares como resultado da degradação dessas células, nomeadamente das células epiteliais dos canais de resina e das células do parênquima circundante.
- À medida que a doença progride, a degenerescência dos tecidos acentua-se e as cavidades aumentam de volume e tendem a fundir-se. Sete semanas após a inoculação, todos os tecidos do caule apresentam sinais de degradação ou mesmo de morte.
- Durante a fase inicial da infecção, os nemátodos são observados no lúmen dos canais de resina do córtex, na periferia do caule. Na fase avançada da doença, os nemátodos surgem também nos canais horizontais e verticais do xilema, e o seu número é dramaticamente elevado nas cavidades após sete semanas de infecção.
- A distribuição dos nemátodos no decurso da infecção está claramente associada ao padrão de degradação dos tecidos que se observa nos vários momentos de amostragem realizados.
- As colorações PAS/Azul de Comassie e Xilidine-Ponceau/Azur II, utilizadas no estudo, providenciaram melhores imagens dos nemátodos nos tecidos vegetais comparativamente às colorações convencionais, tornando mais fácil a detecção do patógeno no hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo H (2005). Contributions to the study of the *Pinus pinaster-Botrytis cinerea* interaction. Braga, Portugal: Universidade do Minho, PhD thesis.

Correia I, Almeida H, Aguiar A, Rocha E and Pessoa J (2006). Desenvolvimento de um índice de selecção de proveniências de *Pinus pinaster* Aiton aos 8 anos, na Mata Nacional de Escaroupim. Silva Lusitana, 14: 1-21

Jones JT, Moens M, Mota M, Li H and Kikuchi T (2008). *Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions. Molecular Plant Pathology, 9: 357-368.

Mamiya Y (1988). History of pine wilt disease in Japan. Journal of Nematology, 20: 219-226

Mota MM, Braasch H, Bravo MA, Penas AC, Burgermeister W, Metge K and Sousa E (1999). First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and Europe. Nematology, 1: 727-734.

Steiner SG and Buhner EM (1934). *Aphelenchoides xylophilus*, n. sp., a nematode associated with blue-stain and other fungi in timber. Journal Agriculture Research, 48: 949-951.

EXECUÇÃO FINANCEIRA

Actividade / Materiais	Custo
Deslocações a Évora (gasolina + portagens) 7 x €60	€ 420
Consumíveis	
1 Kit de facas descartáveis de tungsténio	€ 1166.76
Glutaraldeído a 25% (10 x 10 mL)	€ 54.26
Histo-resina Leica©	€ 249.60
Corantes (Parasonanilina, Azul de Toluidina, Azul de Comassie, Xiliden-Ponceau)	€ 283.40
Outros reagentes (Etanol e acetona p.a., Ácido acético glacial, Ácido clorídrico)	€ 468.12
Outro material consumível	€ 138.00
TOTAL	€ 2780.14

Lisboa, 26 de Julho de 2010

Assinatura do Orientador

Assinatura do Bolseiro